



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/00, C12Q 1/68</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/49282</p> <p>(43) 国際公開日 1998年11月5日(05.11.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/01935</p> <p>(22) 国際出願日 1998年4月27日(27.04.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/111635 1997年4月28日(28.04.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ヘリックス研究所 (HELIX RESEARCH INSTITUTE)[JP/JP] 〒292-0812 千葉県木更津市矢那1532番地3 Chiba, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 村松正明(MURAMATSU, Masaaki)[JP/JP] 〒176-0022 東京都練馬区向山3-15-13 Tokyo, (JP) 矢野和宏(YANO, Kazuhiro)[JP/JP] 〒292-0804 千葉県木更津市文京6丁目11番6号 ポプラガーデンハイム201号室 Chiba, (JP) 野口照久(NOGUCHI, Teruhisa)[JP/JP] 〒251-0037 神奈川県藤沢市鶴沼海岸2-8-11 Kanagawa, (JP) 陶山 明(SUYAMA, Akira)[JP/JP] 〒192-0372 東京都八王子市下柚木3丁目2番6-501 Tokyo, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーロパ特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: METHOD FOR DETECTING CHANGES IN GENE EXPRESSION CAUSED BY THE TRANSFER OF GENE TO BE TESTED</p> <p>(54)発明の名称 被検遺伝子導入による遺伝子発現の変化を検出する方法</p> <p>(57) Abstract A method for detecting changes in gene expression in cells caused by the expression of a gene to be tested by extracting mRNAs from cells into which the gene to be tested has been transferred and expressed and control cells into which the gene to be tested has not been transferred and comparing these mRNAs in constitution. This method also makes it possible to screen genes suffering from changes in the expression thereof in cells due to the expression of the gene to be tested in the cells.</p>		

(57)要約

被検遺伝子を導入して該遺伝子を発現させた細胞および被検遺伝子を導入していない細胞（対照）のそれぞれから細胞内mRNAを抽出し、両者の構成を比較することによって、被検遺伝子が発現したことによる細胞内の遺伝子発現の状態の変化を検出することが可能であることを見出した。さらに、これにより細胞内で被検遺伝子が発現したことにより細胞内で発現が変化した遺伝子を選択することが可能であることを見出した。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AM	アルメニア	FR	フランス	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AT	オーストリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SN	セネガル
AU	オーストラリア	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	UG	ウガンダ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UZ	ウズベキスタン
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	VN	ヴェトナム
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	YU	ユーゴスラビア
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	ZW	ジンバブエ
CH	スイス	IS	アイスランド	NL	オランダ		
CI	コートジボアール	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CM	カメルーン	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CN	中国	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CZ	チェッコ	KR	韓国	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア		

明細書

被検遺伝子導入による遺伝子発現の変化を検出する方法

技術分野

本発明は、被検遺伝子導入による遺伝子発現の変化を検出する方法、および被検遺伝子導入により発現が変化した遺伝子を選択する方法に関する。

背景技術

生体内において遺伝子はそれ自体独立して存在するのではなく、他の遺伝子の発現調節を行うなど他の遺伝子と密接な関連をもって、機能的ネットワークの構成要素として存在しているといえる。従って、ある遺伝子が単離された場合、その遺伝子自体の構造を解析するのみならず、生体内においてこの遺伝子と密接な関連を持った遺伝子を探索することができれば、単離された遺伝子の機能解析のための有効な手段になるといえる。特に、未知の遺伝子が単離された場合において、その遺伝子の発現と特定の既知の遺伝子の発現との関連を明らかにすることができれば、この未知の遺伝子の機能解明に向けて貴重な情報になり得る。しかしながら、特定の遺伝子の発現と他の遺伝子の発現との関連を検出する方法についてはいまだ報告例がない。

ところで、2つの異なる状態の細胞（または組織）における遺伝子発現の違いを検出する方法としては、これまでにディファレンシャルハイブリダイゼーション法 (Gene 145: 313-314 (1994) Cloning and sequence analysis of the human SNAP25 cDNA. N. Zhao, H. Hashida, N. Takahashi & Y. Sakaki) やディファレンシャルディスプレイ (DD) 法 (FEBS Lett 351: 231-236 (1994) Fluorescent differential display: arbitrarily primed. RT-PCR fingerprinting on an automated DNA sequencer. T. Ito, K. Kito, N. Adati, Y. Mitsui, H. Hagiw

ara & Y. Sakaki) などが開発されており、例えば、異なる発生段階の細胞や異なる細胞周期上の時期の細胞、野生株と特定の遺伝子の欠損細胞における遺伝子発現の違いの検出、または健常組織と病的組織における遺伝子発現の違いの検出などに用いられてきた。

しかし、これらはいずれも特定の細胞間においてそれらの遺伝子の構成を変えことなく発現している遺伝子の比較のために用いられており、人為的に細胞に導入された遺伝子の影響による細胞に内在している遺伝子発現の変化の検出に用いられた報告例はない。

発明の開示

本発明は、細胞内に導入された特定の遺伝子の発現による細胞内の他の遺伝子の発現の変化を検出する方法、および特定の遺伝子の導入により細胞内で発現が変化した遺伝子を選択する方法を提供することを課題とする。

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、被検遺伝子を導入して該遺伝子を発現させた細胞および被検遺伝子を導入していない細胞（対照）のそれぞれから細胞内mRNAを抽出し、両者の構成を比較することによって、被検遺伝子が発現したことによる細胞内の遺伝子発現の状態の変化を検出することが可能であることを見出した。さらに、これにより細胞内で被検遺伝子が発現したことにより細胞内で発現が変化した遺伝子を選択することが可能であることを見出した。

また、本発明者らは、異なる細胞における特定の遺伝子の発現量の違いを蛍光を用いて検出する方法 (Nature Biotechnology 14:1675-1680(1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. David J. Lockhart, Helin Dong, Michael C. Byrne1, Maximillian T. Follettie 1, Michael V. Gallo1, Mark S. Chee, Michael Mittmann, Chunwei Wang, Michiko Kobayashi1, Heidi Horton1, and Eugene L. Brown1) に着目し、これを本発

明に応用すべく鋭意研究を行った。その結果、本発明者らは、単離したそれぞれのmRNAから得られるcDNAに異なる蛍光標識を施し、両者を混合して特定のプローブに対してハイブリダイズさせ、プローブにハイブリダイズしたcDNAの発する蛍光色を検出した場合、プローブにハイブリダイズしたcDNAの存在量の違いにより蛍光色の変動し、これにより細胞内で被検遺伝子が発現したことによる遺伝子発現の状態の変化を簡易かつ効率的に検出することが可能であることを見出した。

即ち、本発明は、被検遺伝子導入による遺伝子発現の変化を検出する方法、および被検遺伝子導入により細胞内で発現が変化した遺伝子を選択する方法、好ましくは蛍光色の変化により効率的に検出し、選択する方法に関し、より具体的には、

(1) (a) 発現可能な被検遺伝子が導入された特定の細胞内のmRNA、(b) 発現可能な被検遺伝子が導入されていない特定の細胞内のmRNA、を比較することによって、被検遺伝子が発現したことによる細胞の遺伝子発現の状態の変化を検出する方法、

(2) (a) 被検遺伝子が発現可能に挿入された発現ベクターが導入された特定の細胞内のmRNA、(b) 被検遺伝子を含まないベクターが導入された該特定の細胞内のmRNA、を比較することによって、被検遺伝子が発現したことによる細胞の遺伝子発現の状態の変化を検出する方法、

(3) (a) 及び (b) のmRNAに対してそれぞれ逆転写を行う工程を更に含む、(1) または (2) 記載の方法、

(4) (a) 及び (b) のmRNA群中の、特定のプローブDNAにハイブリダイズするmRNA量の差を検出することによって、被検遺伝子が発現したことによる「該特定のプローブDNAに対応するmRNA」の発現の状態の変化を検出する工程を更に含む、

(1) または (2) 記載の方法、

(5) (a) 及び (b) のmRNAに対して各々逆転写を行って得られるそれぞれのcDNA群中の、特定のプローブDNAにハイブリダイズするcDNA量の差を検出するこ

とによって、被検遺伝子が発現したことによる「該特定のプローブDNAに対応する mRNA」の発現の状態の変化を検出する工程を更に含む、(1)または(2)記載の方法、

(6) (a) 及び (b) の mRNA に対して各々逆転写を行って得られるそれぞれの cDNA 群に対して異なる蛍光標識を施し、それぞれの cDNA 群中の、プローブ DNA にハイブリダイズする cDNA 量の差を、プローブ DNA にハイブリダイズした cDNA が発する蛍光によって検出することを特徴とする、(5) の方法、

(7) 多数のプローブ DNA に対して、ハイブリダイゼーションを行うことを特徴とする、(4) から (6) のいずれかに記載の方法、

(8) 一方の cDNA 群に対してローダミン標識を行い、もう一方の cDNA 群に対して FITC 標識を行うことを特徴とする、(6) または (7) 記載の方法、

(9) (a) 及び (b) の mRNA に対してそれぞれ RT-PCR を行った後、転写産物をゲル上で電気泳動し、泳動パターンの差から被検遺伝子が発現したことによる細胞の遺伝子発現の状態の変化を検出することを特徴とする、(1) または (2) 記載の方法、

(10) (a) 発現可能な被検遺伝子が導入された特定の細胞内の全 mRNA、(b) 発現可能な被検遺伝子が導入されていない該特定の細胞内の全 mRNA、を比較し、(b) に比べて (a) で発現量が変化した遺伝子を検出することによって、被検遺伝子が発現したことによる細胞内の発現量が変化する遺伝子を選択する方法、

(11) (a) 被検遺伝子が発現可能に挿入された発現ベクターが導入された特定の細胞内の全 mRNA、(b) 被検遺伝子を含まないベクターが導入された該特定の細胞内の全 mRNA、を比較し、(b) に比べて (a) で発現量が変化した遺伝子を検出することによって、被検遺伝子が発現したことによって細胞内の発現量が変化する遺伝子を選択する方法、

(12) 被検遺伝子が発現したことによって細胞内の発現量が増加または減少

する遺伝子の検出を、(a)及び(b)のmRNA群中の、特定のプローブDNAにハイブリダイズするmRNA量の差を検出することによって行うことを特徴とする、(10)または(11)記載の方法、

(13) 被検遺伝子が発現したことによって細胞内の発現量が増加または減少する遺伝子の検出を、(a)及び(b)のmRNAに対して各々逆転写を行って得られるそれぞれのcDNA群中の、特定のプローブDNAにハイブリダイズするcDNA量の差を検出することによって行うことを特徴とする、(10)または(11)記載の方法、

(14) (a)及び(b)のmRNAに対して各々逆転写を行って得られるそれぞれのcDNA群に対して異なる蛍光標識を施し、それぞれのDNA群中のプローブDNAにハイブリダイズしたcDNA量の差を、プローブDNAにハイブリダイズしたcDNAが発する蛍光色によって検出することを特徴とする、(13)記載の方法、

(15) 多数のプローブDNAに対して、ハイブリダイゼーションを行うことを特徴とする、(12)から(14)のいずれかに記載の方法、

(16) 一方のcDNA群に対してローダミン標識を行い、もう一方のcDNA群に対してFITC標識を行うことを特徴とする、(14)または(15)記載の方法、

(17) (10)～(16)のいずれかに記載の方法で検出される、特定の遺伝子が発現したことにより細胞内の発現量が増加または減少する遺伝子、

(18) (17)の遺伝子を含むベクター、

(19) (18)のベクターを保持する形質転換体、

(20) (17)遺伝子がコードするアミノ酸配列を含むタンパク質またはペプチド、に関する。

本発明は、第一に、発現可能な被検遺伝子が導入された細胞内のmRNAと発現可能な被検遺伝子が導入されていない細胞内のmRNAとを比較することによって、被検遺伝子が発現したことによる細胞の遺伝子発現の状態の変化を検出する方法に関する。

本発明の検出法において細胞内に導入する被検遺伝子には特に制限はなく、所望の遺伝子を用いることが可能である。被検遺伝子の導入される細胞としては特に制限はなく、種々の動植物細胞、微生物細胞などを用いることが可能である。好ましい動物細胞としては、例えば、COS細胞、NT-2細胞、Ba/F3細胞などが挙げられる。本発明の検出法に用いられる細胞としては、培養細胞のみならず、動物や植物体における細胞も含まれる。

被検遺伝子は、適当な発現ベクターに挿入して細胞に導入することが好ましい。ベクターとしては、宿主細胞に適合するものであれば特に制限はないが、例えば、COS細胞およびNT-2細胞には「pME18Sベクター」(Mol Cell Biol 8: 466-72 (1988) SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. Y. Takebe, M. Seiki, J. Fujisawa, P. Hoy, K. Yokota, K. Arai, M. Yoshida & N. Arai)、Ba/F3細胞には「pCEP4」ベクター (Invitrogen社製) などが好適に用いられる。被検遺伝子の細胞への導入は、例えば、リポフェクタミン法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法など当業者に公知の方法により行うことが可能である。

発現させたmRNAは、例えば、グアニジウム法やオリゴdTカラムを用いた方法 (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons) によりそれぞれの細胞から単離することが可能である。本発明の検出法においては、遺伝子発現の変化を検出するために、通常、単離された細胞内の全mRNAを用いるが、目的に応じて種々の方法で分画したmRNAを用いることも可能である。

本発明の検出法においては、mRNA以外に、mRNAを逆転写して得られるcDNAの比較を行うことも可能である。mRNAの逆転写は、例えば、オリゴdTをプライマーとして用いたスーパースクリプト法 (Current protocols in Molecular Biology e

dit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons) などの方法により行うことが可能である。また、特に、細胞内での発現量の少ない mRNA の比較が必要とされる場合には、RT-PCR (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons) を行うことにより検出感度を高めることができる。

単離した mRNA または cDNA の比較は、例えば、電気泳動を行って泳動パターンの差から行うことが可能である。特に、単離した mRNA から cDNA を作成した後、PCR 法などにより増幅して電気泳動を行うと比較が容易になることがある。

本発明の検出法においては、全体的な遺伝子発現の変化の検出の他、特定のプローブ DNA を用いて特定の mRNA または cDNA の量の差を検出することも可能である。即ち、被検遺伝子を導入して発現させた特定の細胞内の全 mRNA (または cDNA 群) (以下、「被検 mRNA 群」または「被検 cDNA 群」と称する) と被検遺伝子を導入しない該特定の細胞内の mRNA (または cDNA 群) (以下、「対照 mRNA 群」または「対照 cDNA 群」と称する) のそれぞれに対して特定のプローブ DNA を作用させ、該特定のプローブ DNA にハイブリダイズする mRNA (または cDNA) 量の差を検出することによって、被検遺伝子が発現したことによる「該特定のプローブ DNA に対応する mRNA」の発現の状態の変化を検出することが可能である。

用いられる特定のプローブ DNA としては、被検遺伝子の導入による発現の変化を検出したい所望の遺伝子に対するプローブ DNA を用いることが可能であり、特に制限はない。プローブ DNA の標識としては、例えば、 ^{32}P などの放射性同位体による標識、DIG 標識 (ベーリンガー・マンハイム社製)、FITC や ローダミン などの蛍光標識などが挙げられる。

プローブ DNA にハイブリダイズする mRNA (または cDNA) を検出する方法としては、例えば、サザンブロット法、ディファレンシャル法、ディファレンシャルディスプレイ法、分子インデックス法、RNA ドットブロット法、ノーザンハイブリダイゼーション法、プライマー伸長法、S1 マッピング法、定量的 PCR 法、マルチプレック

スPCR法、DNAチップ法などの方法が挙げられる。

また、本発明の検出法において、それぞれのcDNA群に異なる蛍光標識を行い、両者を混合して特定のプローブDNAに作用させ、プローブDNAにハイブリダイズするcDNAの蛍光色を検出することにより、該プローブDNAにハイブリダイズする被検cDNA群中のcDNA量と、該プローブDNAにハイブリダイズする対照cDNA群中のcDNA量との差を簡易に検出することが可能である。例えば、一方のcDNA群をローダミン標識し、もう一方のcDNA群をFITC標識し、両者を混合して特定のプローブに作用させた場合には、特定のプローブDNAにハイブリダイズするDNA中にローダミン標識されたcDNAとFITC標識されたcDNAが等量存在する場合には黄色の蛍光、FITC標識されたcDNAが多く存在する場合には緑色の蛍光、ローダミン標識されたcDNAが多く存在する場合には赤い蛍光を発するため、蛍光色を検出することにより簡易に特定のプローブDNAにハイブリダイズするcDNA量の差（量の多少）を検出することが可能である。蛍光標識としては、上記ローダミン標識とFITC標識以外に、例えば、Texas Red、Cy2、Cy3、Cy5、Cy7などを用いることが可能である。また、蛍光色の検出は、例えば、走査型レーザー共焦点顕微鏡（オリンパス社製 1X70タイプ）などを用いて行うことが可能である。

本発明の検出法においては、多数のプローブDNAを用いることも可能である。この場合には、多数のプローブDNAを基盤上に結合させたチップ（以下、「ゲノムチップ」と称する）（米国特許第5405783号明細書参照）を用いると被検遺伝子の導入による多くの遺伝子の発現の変化を簡易かつ効率的に検出することができる。蛍光色による検出法においては、例えば、ゲノムチップの基盤ガラス上に固着させた多数のプローブDNA上でハイブリダイゼーションを行い、各プローブにハイブリダイズするcDNAの蛍光強度を走査型レーザー顕微鏡を用いて検出することにより多数のプローブDNAに結合するcDNA量の差を同時に検出することが可能である。ゲノムチップを用いる検出法には、反復操作を簡便に行うことが可能であり、かつ廉価であるという利点がある。

本発明は、第二に、上記の検出法により遺伝子発現の変化が検出された遺伝子の中から、発現量が増加する遺伝子を選択する方法に関する。

本発明の選択方法においては、本発明の方法によって発現の変化が検出された遺伝子の中から、所望の遺伝子（例えば、一定値以上の発現量の増加が認められた遺伝子や一定値以上の発現量の減少が認められた遺伝子など）を選択する。選択された遺伝子は、ハイブリダイゼーションに用いたプローブDNAが既知の遺伝子のものであれば、該既知の遺伝子（若しくは近似した塩基配列を有する遺伝子）であるとして特定することが可能である。

本発明の選択法により、被検遺伝子の導入により細胞内の発現量が増加する遺伝子が単離されれば、該遺伝子を適当なベクターに挿入し、このベクターを宿主細胞に導入して、得られた形質転換体から該遺伝子にコードされるタンパク質を調製することが可能である。ベクターの導入される宿主細胞としては、例えば、種々の動物細胞（例えば、COS細胞など）、大腸菌（*E. coli*）、酵母、昆虫細胞などを用いることが可能である。ベクターとしては、COS細胞やNT-2細胞には「pME 18Sベクター」（*Mol Cell Biol* 8: 466-72 (1988) SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. Y. Takebe, M. Seiki, J. Fujisawa, P. Hoy, K. Yokota, K. Arai, M. Yoshida & N. Arai) などが、大腸菌（*E. coli*）細胞には「pETベクター」（タカラ社製）などが、昆虫細胞にはBacPacベクター（クローンテック社製）などが好適に用いられる。ベクターの宿主細胞への導入は、常法により行うことが可能であり、例えば、大腸菌の場合にはエレクトロポレーション法など、COS細胞の場合にはリポフェクタミン（GIBCO-BRL社製）法、昆虫細胞ではバキュロウイルス感染を用いた方法などにより行うことが可能である。組み換えタンパク質を発現した形質転換体からの組み換えタンパク質の精製は、タンパク質の性質に応じ種々のクロマトグラフィー、電気泳動、ゲルろ過な

どの常法を適宜組み合わせる行うことが可能である。また、His-tag法やHA-tag法によるカラム精製などを行うことも可能である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例を挙げてより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[実施例 1] DNAが基盤上に固定されたチップの作製

以下の光リソグラフィ法によりガラス基盤上に配列 1 から 6 (それぞれ配列番号 : 1 から 6 に記載した) のオリゴDNA (表 1) の結合を行った (Hermanson, G. T., et al., "Immobilized Affinity Ligand Techniques", Academic Press, Inc., San Diego, CA(1992); Robertson, S. A., et al., J. Am. Chem. Soc., 113, 2722-2729(1991))。なお、配列 1, 2, 3 は c-fos 遺伝子検出用のプローブ (Cell 32: 1241-55 (1983) [MUID:83180421] Analysis of FBJ-MuSV provirus and c-fos (mouse) gene reveals that viral and cellular fos gene products have different carboxy termini. C. Van Beveren, F. van Straaten, T. Curran, R. Muller & I. M. Verma) であり、配列 4, 5, 6 は β -アクチン検出用のプローブ (J Mol Evol 23: 11-22 (1986) [MUID:86200234] Comparison of three actin-coding sequences in the mouse; evolutionary relationships between the actin genes of warm-blooded vertebrates. S. Alonso, A. Minty, Y. Bourlet & M. Buckingham) である。

表 1

配列 1 : 5'-AGCAGCAGCAACGAGCCCTCCTCCGACTCCCTGAGCTCACCCACGCTGCTGGCCCTG
TGA--3'

配列 2 : 5'-CTCCGACTCCCTGAGCTCACCCACGCTGCTGGCCCTGTGA--3'

配列 3 : 5'-CCACGCTGCTGGCCCTGTGA--3'

配列 4 : 5'-TGGCTCCATCCTGGCCTCACTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGA
GTA-3'

配列 5 : 5'-TGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA-3'

配列 6 : 5'-TGGATCAGCAAGCAGGAGTA-3'

具体的には、まず、スライドガラス (MATSUNAMI, S0313) を 0.05M HCl で表面を 1 時間処理し、超純水で数回洗浄した後、エタノールに浸した。次いで、スライドガラスを A 液 (ジエチルエーテル : トルエン = 1 : 1)、B 液 (トルエン)、C 液 (トルエン : 3-(2-アミノエチルアミノプロピル)トリメトキシラン = 10 : 1) の順で溶液に浸した後、C 液で浸したスライドガラスをコンテナごとデシケーターにいれ窒素ガスで置換した後、一晩アミノシラン化反応を行った。次いで、スライドをエタノールで数回洗浄し、さらに超純水で 2 時間洗浄した。その後、デシケーターの中で真空下に乾燥させた (文献「Hermanson, G.T. et al., Academic Press, Inc., San Diego, California (1992)」参照)。キャッピング剤 (4,5-ジメトキシ-2-ニトロベンジルクロロホルメート) 10mg/ml (THF=テトラヒドロフランに溶解) をシラン化の終わったプレートに乗せて 10 分間反応させた後、THF、超純水の順で洗浄し、窒素ガスで乾燥させた (文献「Robertson, S.A. et al., J. Am. Chem. Soc. 113, 2722-2729 (1991)」参照)。1mM 酢酸カリウム (pH 4.5) をデキャップしたいスライド上の位置に乗せ、顕微鏡下で水銀ランプの励起光 (330-380 フィルター) にて光照射を 30 分間行い、デキャップした。反応後、超純水で数回洗浄した。10mM DSS (Disuccinimidyl suberate) をスライドに塗付し、10 分間反応させた後、洗浄し、窒素ガスを吹き付けて乾燥させた。更に、0.2 μ l のオリゴ DNA (100 μ M) を表面のせて 3 分間反応させた。その後、TE (Tris-HCl (pH 7.5), EDTA 1mM) を数回かけて未反応 NHS 基をなくし、超純水で洗浄し、窒素ガスで乾燥させた。

【実施例 2】 培養細胞より mRNA の調製および蛍光標識 cDNA の合成

培養細胞 Ba/F3 に cAMP 依存性プロテインキナーゼ (以下 PKA) 発現ベクター「SR

a-PKA」 (Mol Cell Biol 9: 831-6 (1989)[89219080] A protein kinase C cDNA without the regulatory domain is active after transfection in vivo in the absence of phorbol ester. M. Muramatsu, K. Kaibuchi & K. Arai) および対照とするコントロールベクター「SRa」 (Mol Cell Biol 8: 466-72 (1988)[88094421] SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. Y. Takebe, M. Seiki, J. Fujisawa, P. Hoy, K. Yokota, K. Arai, M. Yoshida & N. Arai) をそれぞれリポフェクタミン (GIBCO-BRL社製) を用いて導入した (それぞれを(a)群、(b)群とする)。48時間後に細胞を採取し、mRNAを「Quick prep micro mRNA purification kit」 (ファルマシア社製) を用いて調製した。(a)群、(b)群より得られたmRNAのOD値を計測して濃度を統一後、逆転写酵素反応を「cDNA first strand kit」 (ファルマシア社製) を用いて行い、cDNAを調製した。この際 (a) 群より調製したサンプルには「Cy5-dCTP」 (バイオリジカル・デテクション・システムズ社製) を取り込ませてcDNAを蛍光標識した。(b) 群より調製したサンプルには「FluorX-dCTP」 (バイオリジカル・デテクションシステムズ社製) を取り込ませてcDNAを標識した。

〔実施例3〕 蛍光標識cDNAとガラス基盤上の合成DNAのハイブリダイゼーション

(a)、(b)両群のサンプルより調製された蛍光標識cDNAを等量混合した後、ガラス基盤上でハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは、6XSS PE、サケ精子DNA0.5mg/mlに蛍光標識cDNA混合液を添加したものをを用いて、50℃で16時間行い、その後6XSSPE (25℃)、0.5XSSPE (50℃) で洗浄した。

〔実施例4〕 ハイブリダイズした蛍光標識cDNAの検出

蛍光標識cDNAはガラスプレートリーダーを用いて検出した。このリーダーはオリンパスの落射型蛍光顕微鏡にホルダーおよび検出用のSTI高感度カメラ (浜松ホトニクス社製) を組み合わせたものである。その結果、c-fos遺伝子検出用のプ

ローブである配列1、2、3を結合した部位からはFluorXから生ずる緑色の干渉波長が認められた。一方、 β -アクチン検出用のプローブである、配列4、5、6を結合した部位からはFluorX、Cy-Sから生ずる黄色の干渉波長が認められた。このことから、(a)群、(b)群のサンプル中で β -アクチンmRNA量は同じであるがc-fos mRNA量はA群で有意に高いことが判明した。

産業上の利用可能性

本発明により、特定の遺伝子を細胞内に導入し発現させたことによる他の遺伝子の発現の変化を検出する方法、及び発現の変化が検出された遺伝子を選択する方法が提供された。本発明の方法においては、ゲノムチップ法の適用により、特定の遺伝子の導入による細胞内の多くの遺伝子の発現の変化を効率的に検出することが可能である。本発明の方法によれば、例えば、機能が未知の遺伝子を単離した場合に、この遺伝子と密接な関連を持った遺伝子を探索することができるため、単離された遺伝子の機能解析に極めて有効である。

配列表

- (1) 出願人の氏名又は名称： 株式会社ヘリックス研究所
(2) 発明の名称： 被検遺伝子導入による遺伝子発現の変化を検出する方法
(3) 整理番号： H 1 - 8 0 1 P C T
(4) 出願番号：
(5) 出願日：
(6) 優先権のもととなった出願をした国名及び出願の番号：
日本国 平成9年特許願第111635号
(7) 優先日： 1997年4月28日
(8) 配列の数： 6

配列番号： 1

配列の長さ： 60

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： その他の核酸 合成DNA

配列

AGCAGCAGCA ACGAGCCCTC CTCCGACTCC CTGAGCTCAC CCACGCTGCT GGCCCTGTGA 60

配列番号： 2

配列の長さ： 40

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： その他の核酸 合成DNA

配列

CTCCGACTCC CTGAGCTCAC CCACGCTGCT GGCCCTGTGA

40

配列番号： 3

配列の長さ： 20

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： その他の核酸 合成DNA

配列

CCACGCTGCT GGCCCTGTGA

20

配列番号： 4

配列の長さ： 60

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： その他の核酸 合成DNA

配列

TGGCTCCATC CTGGCCTCAC TGTCCACCTT CCAGCAGATG TGGATCAGCA AGCAGGAGTA

60

配列番号： 5

配列の長さ： 40

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： その他の核酸 合成DNA

配列

TGTCCACCTT CCAGCAGATG TGGATCAGCA AGCAGGAGTA

40

配列番号： 6

配列の長さ： 20

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： その他の核酸 合成DNA

配列

TGGATCAGCA AGCAGGAGTA

20

請求の範囲

1. (a) 発現可能な被検遺伝子が導入された特定の細胞内のmRNA、(b) 発現可能な被検遺伝子が導入されていない特定の細胞内のmRNA、を比較することによって、被検遺伝子が発現したことによる細胞の遺伝子発現の状態の変化を検出する方法。
2. (a) 被検遺伝子が発現可能に挿入された発現ベクターが導入された特定の細胞内のmRNA、(b) 被検遺伝子を含まないベクターが導入された該特定の細胞内のmRNA、を比較することによって、被検遺伝子が発現したことによる細胞の遺伝子発現の状態の変化を検出する方法。
3. (a) 及び (b) のmRNAに対してそれぞれ逆転写を行う工程を更に含む、請求項 1 または 2 記載の方法。
4. (a) 及び (b) のmRNA群中の、特定のプローブDNAにハイブリダイズするmRNA量の差を検出することによって、被検遺伝子が発現したことによる「該特定のプローブDNAに対応するmRNA」の発現の状態の変化を検出する工程を更に含む、請求項 1 または 2 記載の方法。
5. (a) 及び (b) のmRNAに対して各々逆転写を行って得られるそれぞれのcDNA群中の、特定のプローブDNAにハイブリダイズするcDNA量の差を検出することによって、被検遺伝子が発現したことによる「該特定のプローブDNAに対応するmRNA」の発現の状態の変化を検出する工程を更に含む、請求項 1 または 2 記載の方法。
6. (a) 及び (b) のmRNAに対して各々逆転写を行って得られるそれぞれのcDNA群に対して異なる蛍光標識を施し、それぞれのcDNA群中の、プローブDNAにハイブリダイズするcDNA量の差を、プローブDNAにハイブリダイズしたcDNAが発する蛍光によって検出することを特徴とする、請求項 5 の方法。
7. 多数のプローブDNAに対して、ハイブリダイゼーションを行うことを特徴と

する、請求項 4 から 6 のいずれかに記載の方法。

8. 一方のcDNA群に対してローダミン標識を行い、もう一方のcDNA群に対して FITC標識を行うことを特徴とする、請求項 6 または 7 記載の方法。

9. (a) 及び (b) の mRNA に対してそれぞれ RT-PCR を行った後、転写産物をゲル上で電気泳動し、泳動パターン之差から被検遺伝子が発現したことによる細胞の遺伝子発現の状態の変化を検出することを特徴とする、請求項 1 または 2 記載の方法。

10. (a) 発現可能な被検遺伝子が導入された特定の細胞内の全 mRNA、
(b) 発現可能な被検遺伝子が導入されていない該特定の細胞内の全 mRNA、を比較し、(b) に比べて (a) で発現量が変化した遺伝子を検出することによって、被検遺伝子が発現したことによる細胞内の発現量が変化する遺伝子を選択する方法。

11. (a) 被検遺伝子が発現可能に挿入された発現ベクターが導入された特定の細胞内の全 mRNA、(b) 被検遺伝子を含まないベクターが導入された該特定の細胞内の全 mRNA、を比較し、(b) に比べて (a) で発現量が変化した遺伝子を検出することによって、被検遺伝子が発現したことによって細胞内の発現量が変化する遺伝子を選択する方法。

12. 被検遺伝子が発現したことによって細胞内の発現量が増加または減少する遺伝子の検出を、(a) 及び (b) の mRNA 群中の、特定のプローブ DNA にハイブリダイズする mRNA 量の差を検出することによって行うことを特徴とする、請求項 10 または 11 記載の方法。

13. 被検遺伝子が発現したことによって細胞内の発現量が増加または減少する遺伝子の検出を、(a) 及び (b) の mRNA に対して各々逆転写を行って得られるそれぞれの cDNA 群中の、特定のプローブ DNA にハイブリダイズする cDNA 量の差を検出することによって行うことを特徴とする、請求項 10 または 11 記載の方法。

14. (a) 及び (b) の mRNA に対して各々逆転写を行って得られるそれぞれ

のcDNA群に対して異なる蛍光標識を施し、それぞれのDNA群中のプローブDNAにハイブリダイズしたcDNA量の差を、プローブDNAにハイブリダイズしたcDNAが発する蛍光色によって検出することを特徴とする、請求項 1 3 記載の方法。

15. 多数のプローブDNAに対して、ハイブリダイゼーションを行うことを特徴とする、請求項 1 2 から 1 4 のいずれかに記載の方法。

16. 一方のcDNA群に対してローダミン標識を行い、もう一方のcDNA群に対してFITC標識を行うことを特徴とする、請求項 1 4 または 1 5 記載の方法。

17. 請求項 1 0 から 1 6 のいずれかに記載の方法で検出される、特定の遺伝子が発現したことにより細胞内の発現量が増加または減少する遺伝子。

18. 請求項 1 7 の遺伝子を含むベクター。

19. 請求項 1 8 のベクターを保持する形質転換体。

20. 請求項 1 7 の遺伝子がコードするアミノ酸配列を含むタンパク質またはペプチド。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/01935

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/00, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/00, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	David J., et al., "Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays", Nature Biotechnology (1996), Vol. 14, No. 13, p.1675-1680	1-20
A	Nanding Z., et al., "Cloning and sequence analysis of the human SNAP25cDNA", Gene (1994), Vol. 145, No. 2, p.313-314	1-20
A	Takashi I., et al., "Fluorescent differential display: arbitrarily primed RT-PCR fingerprinting on an automated DNA sequencer", FEBS Lett. (1994), Vol. 351, No., p.231-236	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
June 26, 1998 (26. 06. 98)

Date of mailing of the international search report
July 7, 1998 (07. 07. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/01935

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl^a C12N 15/00, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl^a C12N 15/00, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), CA(STN), REGISTRY(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	David J., et al. "Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays", Nature Biotechnology (1996), Vol. 14, No. 13, p. 1675-1680	1-20
A	Nanding Z., et al. "Cloning and sequence analysis of the human SNAP25cDNA", Gene (1994), Vol. 145, No. 2, p. 313-314	1-20
A	Takashi I., et al. "Fluorescent differential display: arbitrarily primed RT-PCR fingerprinting on an automated DNA sequencer", FEBS Lett. (1994), Vol. 351, No., p. 231-236	1-20

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.06.98

国際調査報告の発送日

07.07.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

印

4B

9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3449